

NIEKTÓRE INHIBITORY PRZEKAZU SYGNAŁU WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO W HAMOWANIU SYNTEZY CYTOKIN

SOME INHIBITORS OF SIGNAL TRANSDUCTION IN THE DOWN-REGULATION OF CYTOKINE SYNTHESIS

Adrian ZAREBSKI

Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej, Kraków

Streszczenie: Odpowiedź ostrej fazy wywołana przez infekcje, wzrost nowotworu czy zranienia powoduje uwolnienie wtórnych mediatorów – cytokin, których rolą jest przywrócenie homeostazy w organizmie. Nadprodukcja cytokin prowadzić może do wielu chorób lub nawet śmierci. Dlatego też stale poszukiwane są związki będące inhibitorami syntezy cytokin. Celem niniejszej pracy jest charakterystyka działania rooperolu, SB203580 i partenolidu – trzech inhibitorów przekazu sygnału, które z jednej strony mogą być narzędziami do badania molekularnych mechanizmów regulacji metabolizmu komórki, a z drugiej mogłyby być przydatne jako leki przeciwzapalne.

(Postępy Biologii Komórki 2001; Supl. 16: (15–22))

Słowa kluczowe: odpowiedź ostrej fazy, rooperol, SB203580, partenolid, cytokiny, kinaza p38

Summary: Acute phase response caused by infections, tumor growth and injuries results in the release of secondary mediators – cytokines, which serve to restore the organism's homeostasis. Overexpression of the cytokines can lead to many diseases or even death. Therefore, substances with the ability to block cytokines' synthesis are being constantly searched for. The aim of this paper is to characterize action of rooperol, SB203580 and parthenolide – the three signal transduction inhibitors, which, on the one hand, could be tools in the investigation of the molecular mechanisms of cell metabolism regulation and, on the other hand, might be useful as antiinflammatory drugs.

(Advances in Cell Biology 2001; Supl. 16: 15–22)

Key words: acute phase response, rooperol, SB203580, parthenolide, cytokines, p38 kinase

*Praca finansowana z grantu KBN 0366/P04/99/16. Autor składa podziękowania panu prof. dr hab. Aleksandrowi Kojowi za krytyczne uwagi przy redagowaniu pracy.

WSTĘP

Infekcje, zranienia czy wzrost nowotworu indukują serię reakcji miejscowych zwanych odpowiedzią ostrej fazy, w czasie której dochodzi do uwolnienia komórkowych mediatorów – cytokin. Wydzielone miejscowo cytokiny działają na inne komórki gospodarza prowadząc do reakcji systemowej manifestującej się gorączką, leukocytozą, zwiększonym poziomem hormonów i zmienionym składem białek osocza [13]. Cytokiny prozapalne IL-1, TNF α , IL-18 odgrywają kluczową rolę w pierwszych stadiach zapalenia [1]. Po związaniu do powierzchniowych receptorów na komórkach docelowych wywołują złożoną kaskadę sygnalizacyjną prowadzącą do aktywacji wielu czynników transkrypcyjnych, wśród których za najważniejsze uchodzą NF- κ B i AP-1. Czynniki te wiążą się do promotorów wielu genów odpowiedzialnych za rozwój późniejszych stadiów reakcji zapalnej, np. m.in. cytokin z rodziny IL-6 [2]. W komórkach wątroby, pod wpływem IL-6 związanej do powierzchniowych receptorów, obserwuje się zmiany w produkcji białek osocza zwanych białkami ostrej fazy. W proces ten zaangażowana jest kinaza JAK oraz czynniki transkrypcyjne z rodziny STAT [10].

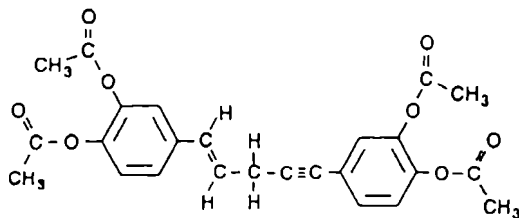
Reakcja ostrej fazy jest fizjologicznym procesem służącym przywróceniu homeostazy w organizmie. W niektórych przypadkach dochodzi jednak do nadprodukcji cytokin lub do chronicznego stanu zapalnego. To może być przyczyną destrukcji tkanek, wielu chorób, np. reumatoidalnego zapalenia stawów, astmy lub nawet śmierci (np. w szoku septycznym).

Stale poszukuje się związków o działaniu przeciwwzapalnym, które mogłyby zostać wykorzystane w farmakologii. Intensywne badania prowadzi się nad cytokinami przeciwwzapalnymi, które hamują reakcję zapalną. Od dawna jako leki stosowane są też glukokortykoidy. Związkami hamującymi odpowiedź ostrej fazy okazały się substancje pochodzenia roślinnego stosowane w ludowej medycynie różnych krajów. Potencjalnymi lekami przeciwwzapalnymi wydają się być syntetyczne inhibitory przekazu sygnału w komórkach zaangażowanych w rozwój reakcji zapalnej [14].

ROOPEROL

Południowoafrykańska roślina *Hypoxis rooperi* stosowana od dawna w afrykańskiej medycynie ludowej jest źródłem dikatecholu zwanego rooperolem. Związek ten wykazuje działanie przeciwwzapalne i przeciwnowotworowe, stąd zainteresowanie naukowców zmierzające do wyjaśnienia mechanizmów działania na poziomie molekularnym oraz potencjalnych zastosowań jako składnika leków.

W badaniach stosuje się estry rooperolu, najczęściej dwu- i czteroocian (rys. 1). Estryfikacja zapobiega niekorzystnemu efektowi: możliwości tworzenia się hydroadtlenków lipidów w obecności jonów metali przejściowych i rooperolu. Estry-



RYSUNEK 1. Czteroocetan rooperolu

fikacja zwiększa również chemiczną stabilność cząsteczki. Forma aktywna inhibitora uwalniana jest w komórkach przy udziale esteraz wewnątrzkomórkowych [3].

W wysokich stężeniach rooperol okazał się być inhibitorem lipooksygenazy [21]. W stężeniach poniżej 10 μM wywołuje inne efekty bez hamowania aktywności lipooksygenazy. Obserwuje się hamowanie produkcji NO w makrofagach i komórkach śródbłonkowych [3]. Zahamowaniu ulega też synteza IL-1 β , TNF α i IL-6 w ludzkich i szczurzych makrofagach płucnych oraz monocytach krwi. Podobnie zahamowanie produkcji IL-1 β , TNF α i IL-6 na poziomie mRNA i białka obserwowano w monocytarnej linii U937 [8].

Wykazano zahamowanie aktywacji czynników transkrypcyjnych NF- κB i AP-1 w obecności rooperolu [8]. Przyjmuje się, że w aktywacji tych czynników w komórkach stymulowanych cytokinami prozapalnymi, czynnikami stresowymi oraz lipopolisacharydem generowane są reaktywne formy tlenu jako wtórne przekaźniki sygnału [20]. Rooperol charakteryzuje się własnościami oksydoredukcyjnymi, dlatego też jednym z proponowanych mechanizmów działania jest jego rola jako antyoksydanta zmiatającego wolne rodniki tlenowe. Dane te jednak wymagają dalszego potwierdzenia.

Rooperol hamuje ekspresję indukowalnej syntazy tlenu azotu iNOS i białek adhezyjnych VCAM-1 w komórkach śródbłonka stymulowanych TNF α i IFN γ . VCAM-1 służy jako molekula adhezyjna dla monocytów. Przedłużona ekspresja białek adhezyjnych podczas stanu zapalnego może doprowadzić do uszkodzenia komórek endotelialnych. Zahamowanie ekspresji VCAM-1 wydaje się być efektem korzystnym również z powodu zahamowania rekrutacji leukocytów, w tym eozynofili, do płuc.

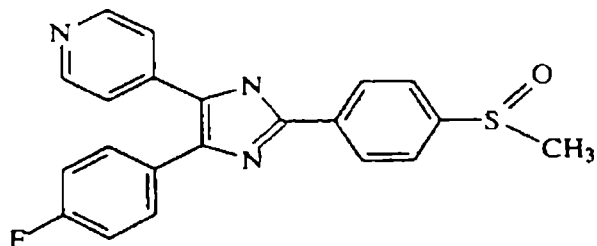
Molekularne mechanizmy działania rooperolu nie są znane i wymagają dalszych badań. Zakłada się możliwość hamowania kilku procesów w komórkach w wyniku działania na różnych etapach przekazu sygnału. Prawdopodobnie hamowany jest etap inicjacji transkrypcji, nie można też wykluczyć wpływu inhibitora na inne procesy, jak np. aktywacja kinaz białkowych czy wpływ na stabilność mRNA [8].

Dzięki temu, że rooperol hamuje produkcję cytokin prozapalnych bez wyraźnego wpływu na całkowitą syntezę białka, metabolizm i żywotność komórek, wydaje się być potencjalnym składnikiem leków przeciwzapalnych. Hamowanie syntezy

iNOS mogłoby być wykorzystane także w leczeniu astmy, ponieważ uwalnianie tlenu azotu odgrywa istotną rolę w patogenezie tej choroby [8].

SB203580

Firma farmaceutyczna *SmithKline Beecham Pharmaceuticals* wyprodukowała szereg syntetycznych inhibitorów kinaz białkowych, z których SB203580 okazał się



RYSUNEK 2. Pirydynylimidazol SB203580

być czynnikiem przeciwzapalnym. Inhibitor ten o strukturze pirydynylimidazolu (rys. 2) z dużą swoistością hamuje aktywność kinazy p38 z rodziny kinaz MAP [16] (tab. 1).

Do grupy kinaz p38 zwanej też CSBP lub SAPK2 zaliczane są co najmniej cztery izoformy α , β , γ i δ . Wszystkie wykazują ok. 60–70% homo-

logii sekwencji aminokwasowej, α i β są powszechne, a γ charakterystyczna jest dla mięśni szkieletowych. Wspólną cechą strukturalną izoform jest występowanie 12-aminokwasowej pętli z motywem TGY. Cytokiny prozapalne, lipopolisacharyd oraz stres komórkowy uruchamiające kaskadową aktywację kinaz białkowych prowadzą do fosforylacji tyrozyny i treoniny w pętli aktywacyjnej. Forma nieufosforylowana kinazy nie wiąże ATP, związanie następuje dopiero po aktywacji. Inhibitor SB203580 konkuruje z ATP o miejsce wiązania w centrum aktywnym wiążąc się z jednakowym, wysokim powinowactwem zarówno do formy nieufosforylowanej, jak i ufosforylowanej kinazy [16].

Inhibitor SB203580 hamuje specyficznie tylko aktywność izoform α i β kinazy p38 bez wyraźnego wpływu na aktywność pozostałych izoform czy też innych kinaz białkowych.

SB203580 hamuje produkcję IL-1 i TNF α w makrofach stymulowanych LPS. Zahamowanie obserwuje się na poziomie translacji bez wpływu na transkrypcję mRNA [17]. Podobnie zahamowanie syntezy IL-4, IL-5, IL-13 i TNF α

TABELA 1. Profil wrażliwości kinaz białkowych na SB203580 (wg [16], zmodyfikowane)

Kinaza	SB203580 (IC ₅₀ , nM)
p38 α	48
p38 β	50
p38 γ	>10000
p38 δ	>10000
JNK1	~5000
JNK2 β 1	280
JNK2 α 2	1900
ERK2	>100000
PKA	83000
PKC β 2	>50000
MAPKAP2	>10000
c-Raf	360

na etapie translacji stwierdzono w limfocytach T [14]. Wykazano, że kinaza p38 zaangażowana jest w fosforylację białka o masie 37–40 kDa związanego do regionu zawierającego sekwencję AUUUA na 3' końcu mRNA cytokin, np. IL-1, TNF α [16]. Białko to warunkuje stabilność mRNA, przypuszcza się też, że może ono oddziaływać z 5' końcem uczestnicząc w inicjacji translacji. Zahamowanie aktywności kinazy p38 powoduje akumulację transkryptu bez inicjacji translacji [18].

Inny mechanizm obserwuje się w przypadku hamowania syntezy IL-6 w fibroblastach stymulowanych IL-1 i TNF α [4], oraz uwalniania IFN γ i IL-10 przez limfocyty T [14]. Zahamowanie odbywa się na etapie inicjacji transkrypcji. Kinaza p38 bierze udział w fosforylacji czynników transkrypcyjnych, np. ATF2, białka Hsp 27 [16] oraz TBP (TATA binding protein) wiążącego się do sekwencji TATA box [6]. Zahamowanie fosforylacji uniemożliwia związaną się czynników transkrypcyjnych i innych białek regulatorowych do regionów promotorowych genów cytokin. Kinaza p38 wydaje się nie mieć bezpośredniego wpływu na aktywację NF- κ B [11], jednak fosforylacja TBP jest niezbędna do inicjacji transkrypcji oraz do oddziaływania innych białek z NF- κ B, stąd też obserwuje się zahamowanie syntezy białek pozostających pod kontrolą NF- κ B w obecności SB203580 [6].

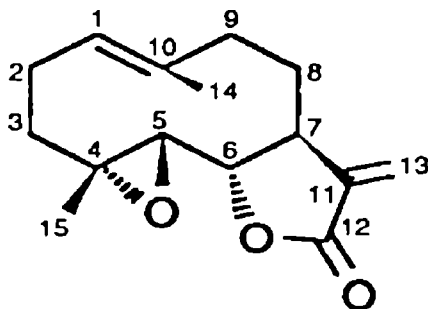
Ostatnie dane sugerują udział kinazy p38 w szlaku aktywacji czynników STAT przy udziale IL-6 w komórkach wątroby. Kinaza p38 wydaje się być także zaangażowana w modulację syntezy białek ostrej fazy [22].

Zdolność SB203580 do hamowania produkcji NO w chondrocytach stymulowanych IL-1 wskazuje na potencjalną możliwość zastosowań do leczenia reumatoidalnego zapalenia stawów [16]. Poza tym inhibitor ten jest szeroko stosowany do badania funkcji kinazy p38, która reguluje wiele istotnych procesów metabolicznych w komórce.

PARTENOLID

Partenolid jest związkiem występującym obficie w soku południowoamerykańskiej rośliny *Tanacetum parthenium*. Wcześniej przebadane zostało 54 gatunki roślin rosnących w Meksyku i stosowanych do leczenia chorób o charakterze zapalnym. Głównym składnikiem leczniczym kilku z nich okazały się być laktony seskwiterpenów. Do tej grupy należy także partenolid [5].

Cząsteczka partenolidu zawiera trzy charakterystyczne motywy: pierścień epoksydowy, pierścień laktonowy z grupą egzometylenową oraz pierścień izopreno-



RYSUNEK 3. Partenolid

dowy (rys. 3). Strukturą kluczową, warunkującą inhibitorowe własności partenolidu wydaje się być pierścień laktonowy z grupą egzometylenową. Wraz z pierścieniem izoprenoidowym tworzy on tzw. „reaktywny system Michaela”, który łatwo reaguje z resztami nukleofilowymi [9]. Proponowanym mechanizmem działania partenolidu jest nieodwracalne wiązanie się do grup –SH cystein w łańcuchu polipeptydowym. Częsteczkami targetowymi wydają się być kinazy białkowe z grupy kinaz MAP, leżące w centrum szlaków przekazu sygnału od różnych czynników wzrostowych, cytokin i hormonów. Stwierdzono zależne od dawki hamowanie aktywności kinazy p38, ERK1 i ERK2 oraz JNK1 w obecności mikromolowych stężeń partenolidu. Ten mechanizm potwierdzają doświadczenia z użyciem ditiotretolu, β -merkaptetanolu i L-cysteiny, które jako donory grup –SH znoszą inhibitorową aktywność partenolidu [12].

Wykazano hamowanie syntezy indukowalnej cyklooksygenazy (COX-2) oraz IL-1 i TNF α w obecności partenolidu w szczurzych makrofagach alweolarnych stymulowanych LPS [12]. Proces ten zachodzi na etapie aktywacji NF- κ B. Eksperymenty wskazują, że partenolid hamuje fosforylację, dysocjację i degradację w proteasomie inhibitora I κ B. Partenolid nie wykazuje własności antyoksydanta, nie blokuje też wiązania aktywnego NF- κ B do regionów promotorowych genów. Zahamowanie odbywa się prawdopodobnie na etapie kaskady kinaz białkowych prowadzących do fosforylacji inhibitora I κ B i aktywacji NF- κ B [9].

Udowodniono również wpływ partenolidu na zahamowanie syntezy białek ostrej fazy w komórkach wątroby. Pod wpływem partenolidu następuje zahamowanie fosforylacji tyrozyny STAT 3 w komórkach HepG2 stymulowanych onkostatyną M. To zapobiega dimeryzacji czynników STAT i ich migracji do jądra komórkowego. Prawdopodobnie partenolid hamuje aktywność kinazy JAK bądź innych białek modulujących jej aktywność [19].

Przeciwwzpalne działanie partenolidu związane jest z hamowaniem produkcji cytokin prozapalnych pozostających pod kontrolą NF- κ B, oraz hamowaniem syntezy białek ostrej fazy regulowanych przez czynniki STAT. Doniesiono, że partenolid znalazł zastosowanie jako składnik leku przeciw migrenie [9]. Konieczne są jednak dalsze badania prowadzące do wyjaśnienia molekularnych mechanizmów działania partenolidu oraz możliwości jego zastosowań terapeutycznych.

WNIOSKI KOŃCOWE

Opisane powyżej inhibitory przekazu sygnału wewnątrzkomórkowego są niezwykle przydatne do wyjaśnienia mechanizmów regulacji metabolizmu i ekspresji genów. Jest prawdopodobne, że mogą one także znaleźć zastosowania jako pomocnicze leki w niektórych schorzeniach zapalnych.

LITERATURA

- [1] BALDWIN AS. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Ann Rev Immunol* 1996; **14**: 649-683.
- [2] BAUMANN H, GAULDIE J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994; **15**: 74-80.
- [3] BERETA J, BERETA M, ALLISON AC, KRUGER BP, KOJ A. Inhibitory effect of dicatechol rooperol on VCAM-1 and iNOS expression in cytokine stimulated endothelium. *Life Sci* 1997; **60**: 325-334.
- [4] BEYAERT R, CUENDA A, VADEN BERGHE W, PLAISANCE S, LEE JC, HAEGEMAN G, COHEN P, FIERIS W. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J* 1996; **15**: 1914-1923.
- [5] BORK PM, SCHMITZ ML, KUHN M, ESHER C, HEINRICH M. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF- κ B. *FEBS Lett* 1997; **402**: 85-90.
- [6] CARTER BA, KNUDSON KL, MONICK MM, HUNNINGHAKE GW. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF- κ B-dependent gene expression. *J Biol Chem* 1999; **274**: 30858-30863.
- [7] GUZDEK A, NI \dot{z} ANKOWSKA E, ALLISON AC, KRUGER PB, KOJ A. Cytokine production in human and rat macrophages and dicatechol rooperol and esters. *Biochem Pharmacol* 1996; **52**: 991-998.
- [8] GUZDEK A, ROKITA H, CICHY J, ALLISON AC, KOJ A. Rooperol tetraacetate decreases cytokine mRNA levels and binding capacity of transcription factors in U937 cells. *Mediat Inflamm* 1998; **7**: 13-18.
- [9] HEHNER SP, HEINRICH M, BORK PM, VOGT M, RATTER F, LEHMANN V, SCHULZE-OSTHOFF K, DROEGE W, SCHMITZ LM. Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF- κ B by preventing the degradation of I κ B- α and I κ B- β . *J Biol Chem* 1998; **273**: 1288-1297.
- [10] HEINRICH PC, BEHRMANN I, MULLER-NEWEN G, SCHAPER F, GRAEVE L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp 130/Jak/STAT pathway. *Bioch J* 1998; **334**: 297-314.
- [11] HERLAAR E, BROWN Z. P38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today* 1999; **5**: 439-447.
- [12] HWANG D, FISCHER NH, JANG BC, TAK H, KIM JK, LEE W. Inhibition of the expression of inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines by sesquiterpene lactones in macrophages correlates with the inhibition of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; **229**: 810-818.
- [13] KOJ A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1317**: 84-94.
- [14] KOJ A. Termination of acute-phase response: role of some cytokines and anti-inflammatory drugs. *Gen Pharmac* 1998; **31**: 9-18.
- [15] KOPRAK S, STARUCH MJ, DUMONT FJ. A specific inhibitor of the p38 mitogen activated protein kinase affects differentially the production of various cytokines by activated human T cells: dependence on CD28 signaling and preferential inhibition of IL-10 production. *Cell Immunol* 1999; **192**: 87-95.
- [16] LEE JC, KASSIS S, KUMAR S, BADGER A, ADAMS JL. p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors-mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol Ther* 1999; **82**: 389-397.

- [17] LEE JC, LAYDON JT, MCDONNELL PC, GALLAGHER TF, KUMAR S, GREEN D, MCNULTY D, BLUMENTHAL MJ, HEYS JR, LANDVATTER SV, STRICKLER JE, MCLAUGHLIN MM, SIEMENS IR, FISHER SM, LIVI GP, WHITE JR, ADAMS JL, YOUNG PR. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994; **372**: 739–746.
- [18] LEE JC, YOUNG PR. Role of CSBP/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms. *J Leukoc Biol* 1996; **59**: 152–157.
- [19] SOBOTA R, SZWED M, KASZA A, BUGNO M, KORDULA T. Parthenolide inhibits activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) induced by cytokines of the IL-6 family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **267**: 329–333.
- [20] SUZUKI YJ, MIZUMO M, PACKER L. Signal transduction for nuclear factor B activation. Proposed localization of antioxidant-inhibitable step. *J Immunol* 1994; **153**: 5008–5015.
- [21] VAN DER MERWE MJ, JENKINS K, THERON E, VAN DER VALT BJ. Interaction of the di-catechols rooperol and nordihydroguaiaretic acid with oxidative systems in the human blood. *Biochem Pharmacol* 1993; **45**: 303–311.
- [22] ZAUBERMAN A, ZIPORI D, KRUPSKY M, BEN-LEVY R. Stress activated protein kinase p38 is involved in IL-6 induced transcriptional activation of STAT3. *Oncogene* 1999; **18**: 3886–3893.

Adres autora: Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków
e-mail: adrian@mol.uj.edu.pl